

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200326122

UDC_____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

热带太平洋深海微生物抗菌、抗肿瘤活性
初步研究

A primary study on antimicrobial and antitumor
activities of microorganisms isolated from deep sea
in the tropical Pacific Ocean

王祥敏

指导教师姓名: 徐 洵 院 士

叶德赞 研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 10 月 08 日

论文答辩时间: 2006 年 11 月 18 日

学位授予日期: 2006 年 12 月 日

答辩委员会主席: 郑天凌 教授

评 阅 人: 孙 明 教授

喻子牛 教授

2006 年 11 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是在国家海洋局第三海洋研究所、国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室进行的研究工作，在本人导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其机构送交论文的纸质版或电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（√）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
1 前言.....	1
1.1 活性微生物研究简史.....	1
1.2 海洋活性微生物研究概况.....	3
1.2.1 海洋微生物多样性.....	3
1.2.2 海洋活性微生物研究简史.....	4
1.2.3 海洋活性微生物研究的优势与不足.....	6
1.2.4 海洋微生物产生的生物活性物质.....	7
1.3 深海活性微生物研究概况.....	10
1.4 难培养或不能培养微生物研究方法.....	14
1.5 宏基因组技术在海洋微生物活性物质方面的应用.....	16
1.6 微生物药物筛选.....	17
1.7 本论文的研究目的、意义及内容.....	19
2 材料和方法.....	21
2.1 材料.....	21
2.2 方法.....	29
3 结果与分析.....	32
3.1 来自海兔抗感染活性菌株的筛选.....	32
3.2 大洋抗感染活性菌株的筛选.....	34
3.2.1 样品采集.....	34
3.2.2 菌株分离.....	35
3.2.3 深海活性微生物菌株的筛选.....	36
3.2.4 深海活性微生物抑菌活性.....	37

3.2.5 活性菌株的鉴定.....	39
3.3 大洋细菌 DY-Y-11A1A 抑菌活性研究.....	39
3.3.1 大洋细菌 DY-Y-11A1A 的抑菌活性.....	39
3.3.2 盐份对大洋细菌 DY-Y-11A1A 生长及活性物质产生的影响	39
3.3.3 不同培养基对大洋细菌 DY-Y-11A1A 生长及活性物质产生的影响	40
3.3.4 发酵时间的影响.....	41
3.3.5 理化因子对无细胞滤液中活性物质的影响.....	41
3.3.6 无细胞滤液对蛋白酶的稳定性.....	42
3.3.7 DY-Y-11A1A 菌株抗菌活性成分溶解特性	42
3.3.8 无细胞滤液对海洋酵母菌的抑制活性.....	42
3.3.9 DY-11A1A 生理生化特征	43
3.3.10 DY-11A1A 菌株的鉴定.....	44
3.4 深海抗肿瘤活性微生物菌株的筛选与鉴定.....	46
3.4.1 菌株来源与鉴定	46
3.4.2 深海微生物菌株抗肿瘤活性筛选.....	51
3.4.3 活性菌株的大规模发酵.....	58
4 讨论.....	60
4.1 来自海兔活性微生物菌株的筛选.....	60
4.2 深海微生物菌株的分离.....	60
4.3 深海活性微生物菌株的筛选	61
4.4 深海活性微生物菌株的鉴定.....	62
4.5 DY-Y-11A1A 菌株抗菌活性研究.....	63
4.7 展望.....	65
5 总结.....	66
参考文献	68
致 谢.....	75
附录.....	76

Catalogue

Chinese abstract.....	I
English abstract.....	III
1 Introduction	
1.1 the simple history of active microorganisms.....	1
1.2 general situation of marine active microorganisms.....	3
1.2.1 diversity of marine microorganisms.....	3
1.2.2 the simple history of active marine microorganisms.....	4
1.2.3 predominance and deficiency of studies on marine active microorganisms..	6
1.2.4 bio-active substance produced by marine microorganisms.....	7
1.3 general situation of deep-sea microorganisms.....	10
1.4 study of less-culturable and unculturable microorganisms.....	14
1.5 the use of metagenomic methods in the field of bio-active substance produced by marine microorganisms.....	16
1.6 screening of microbial drugs	17
1.7 purpose and significance of this thesis.....	19
2 Materials and methods	
2.1 materials.....	21
2.2 methods.....	29
3 Results and analysis	
3.1 screening of strains with anti-infective activity from sea-hare.....	32
3.2 screening of strains with anti-infective activity from Pacific Ocean.....	34
3.2.1 collection of samples.....	34
3.2.2 isolation of strains from ocean.....	35
3.2.3 screening of active strains from deep-sea.....	36
3.2.4 antimicrobial activity of deep-sea microorganisms.....	37
3.2.5 identification of active strains.....	39

3.3 study of antimicrobial activity of DY-Y-11A1A from deep-sea	39
3.3.1 antimicrobial activity of DY-Y-11A1A.....	39
3.3.2 effects of salinity on growth and antimicrobial activity of DY-Y-11A1A.....	39
3.3.3 effects of culture medium on growth and antimicrobial activity of DY-Y -11A1A	40
3.3.4 effects of incubation time.....	41
3.3.5 effects of chemical and physical factor on antimicrobial activity of non-cell fermentations.....	41
3.3.6 effects of proteinase on antimicrobial activity of non-cell fermentations	42
3.3.7 diffuence characteristic of substance with antimicrobial activity produced by DY-Y-11A1A.....	42
3.3.8 antagonistic activities of strain DY-Y-11A1A to marine yeasts.....	42
3.3.9 physiological and biochemical characteristics of DY-Y-11A1A.....	43
3.3.10 Identification of strain DY-Y-11A1A.....	44
3.4 screening and identification of deep-sea microorganisms with antitumor activity	46
4 Discussion	
4.1 screening of strains with anti-infective activity from sea-hare.....	60
4.2 isolation of deep-sea microorganisms.....	60
4.3 screening of bio-active microorganisms from deep-sea.....	61
4.4 identification of bio-active microorganisms from deep-sea.....	62
4.5 study of antimicrobial activity of DY-Y-11A1A from deep-sea.....	63
4.7 view.....	65
5 conclusion	
reference.....	68
acknowledgement.....	75
appendix.....	76

摘要

海洋生态环境十分独特,使海洋微生物产生了与陆地微生物不同的代谢系统和防御体系,特别是从海洋微生物中提取的生物活性物质常常具有新颖的化学结构和特异的生理功能,在抗菌、抗病毒、抗肿瘤等方面具有独特效应,已成为开发新药、特药的主要研究方向之一。

目前国际上海洋微生物资源的开发研究都主要集中在近海。由于采样条件和培养条件的限制,远海和深海微生物研究的比较少。本文从热带太平洋西部“暖池”区、中部和东部“多金属结核区”以及东太热液区深海区采集了海底底质样、水样和部分生物样,分离深海微生物,筛选具有抗菌和抗肿瘤活性的菌株,并对活性微生物菌株的生理生化特性,活性微生物菌株的分子鉴定等进行了初步的研究,为进一步研制具有抗感染和抗肿瘤活性深海微生物药物提供一些基本参数和活性菌株。

从热带太平洋的生物、海水、沉积物样品中分离到细菌、酵母和霉菌共 475 株。选择 8 个指示菌并采用圆形纸片法对分离菌株的发酵液进行抗菌和抗肿瘤活性筛选,获得 20 个具有抗菌和/或抗肿瘤活性的微生物菌株。细菌、酵母和霉菌活性菌株的筛选得率都比较低,分别为 5.4%、2.2%和 3.4%。同时采用分子生物学方法鉴定了活性菌株,除 4 株未有结果外,其余菌株分归为 9 个属,其中芽孢杆菌属 7 株、占活性菌株的 35%,盐单胞菌属 2 株、占 10%,其它菌属各 1 株、占 5%。抑菌谱分析表明,大多数活性菌株对革兰氏阳性细菌具有抑制作用,而来源于鱼体的菌株具有广谱性,对细菌、真菌均有拮抗作用,另外还发现一株酵母(*Rhodosporidium toruloides*)可抑制金黄色葡萄球菌。作者提出“活性指示(Activity Index)”参数,对活性菌株的抗菌谱和活性强度进行综合评估,也表明源于鱼体的菌株的活性指示值较高。这 4 株芽孢杆菌尤其是 DY-Y-11A1A 菌株,具有潜在的后续开发价值。

对具有广谱抗菌且具有抗肿瘤活性的 DY-Y-11A1A 菌株进行了初步研究,考察了盐份、培养基种类、发酵时间,这三因子对此海洋细菌生长和活性物质产生的影响,结果表明活性物质产生的最佳条件是:盐份为 20,培养基为 M2 培养基,发酵时间为 3 天。理化因子研究表明, DY-Y-11A1A 菌株产生的活性物质对 PH、温度以及蛋白酶 K 具有很强的耐受性。并采用 BIOLOG 微生物鉴定系统得到该菌

的 C 源利用图谱。通过形态观察和 16SrRNA 序列的测定，初步判定该菌为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp)

根据采样站位以及样品层次的不同，从分离到的深海微生物中挑选 24 株霉菌，31 株细菌，各发酵 300mL ,乙酸乙酯抽提发酵液和菌体，所得 110 个粗抽提物，通过 SRB 法和 MTT 法检测粗抽提物的抗肿瘤活性。最终获得 11 株抗肿瘤活性较高的微生物菌株。对其中 3 株(M-1185、M-1020 及 B-3029)进行大规模发酵 (30L) ,抗肿瘤活性成分的分离纯化、结构剖析等正在进行中。对供测试的 55 株深海微生物菌株进行了分子鉴定，结果表明绝大多数霉菌分布在青霉属、拟青霉属、曲霉属、头孢霉属，细菌分布在盐单胞菌属、芽孢杆菌属以及假单胞菌属等。

关键词：筛选 ； 鉴定；海洋微生物；生物活性；热带太平洋

Abstract

There is different metabolism and recovery system between marine microorganisms and terrestrial ones, because of sea hold unique environment. bio-active substances extracted from marine microorganisms have unique chemical structure and physiological function, especially, biological activities are mainly focused in the area of antibiotic, anticancer and antiviral properties. Marine microorganisms for potential pharmaceutical resources have formed a hot field for searching for novel and specific drugs since past years.

The research of marine micro-organisms resources is mainly focused in offing at present. We pay Less attention about open sea and deep-sea because of the restriction of sampling and culturing condition. In this thesis we collected samples of sediments, waters and organisms fauna from the “warm pool” region of west pacific ocean, middle pacific ocean and the “multi-metal nodules” region and covering “hydrothermal vents” of east pacific ocean., isolated deep-sea microorganisms, screened bio-active strains with antimicrobial and antitumor activities, and further investigated the physiological and bio-chemical characteristics of active microbes and finished their molecular identification. We will provide some basic information and some bioactive strains for the discovery of deep-sea microbial drug.

20 bioactive microbial strains, which showed the capacities of anti-microbes and/or anti-tumors, were obtained, being screened, by means of 8 screening models and a paper-dish technique, from a total of 475 strains consisting of bacteria, yeasts and molds isolated from the samples of fishes, sea waters and sediments taken in the tropical Pacific Ocean.

The discovered rate of the bioactive stains was quite low, 5.4% in the bacterial isolates, 2.2% in the yeasts and 3.4% in the molds respectively. The taxonomy of the 20 bioactive strains, identified by the molecular biology technique, belong to 9 genus, with 7 strains in *Bacillus*, accounting for 35% of the total 20 strains, 2 in *Halomonas* for 10% and only 1 in the other each genus for 5%, except the 4 unidentified strains. The spectra of the bioactive strains against 8 models demonstrated that G⁺ bacteria in the screening models were inhibited by most of the bioactive strains, including Stains Y-2033(*Rhodospiridium toruloide*) which was interestingly against *Staphylococcus aureus*; while the strains isolated from fishes showed wide spectra against bacteria, fungi activities. When a term, “activity index” is suggested by the authors to compare bioactivities among the screened strains in a combination of 2 parameters, spectra and strength of activity, it is found that 4 strains of *Bacillus*, isolated from fishes, illuminated higher values of the index, which could be the candidates for further developments.

Strain DY-Y-11A1A with broad-spectrum antimicrobial and antitumour activities was studied primarily. We investigated the effects of salinity、culture medium and incubation time on growth and antimicrobial activity of DY-Y-11A1A. The results showed that the optimum conditions for the produce of substances with antimicrobial activity are 20 in salinity、M2 in culture medium and 3d in incubation time. The study about phy-chemical factors showed active substances with antimicrobial activities produced by strain DY-Y-11A1A had high patience to pH、temperature and proteinase K. By means of biolog Microstation system its carbon-utilizing spectrum was obtained as well. Through morphology and molecular identification of 16SrRNA gene sequences, we identified primarily strain DY-Y-11A1A as *Bacillus* sp

According to the difference of the sampling sites and sample arrange

—ments, 24 moulds and 31 bacterium isolated from deep-sea microbes were fermented into 1000-ml Erlenmeyer flasks containing 300ml broth medium. Each of culture both and mycelium was extracted by ethyl acetate and 110 Coarse substances were obtained. Their activities of antitumour were screened through SRB and MTT methods. 11 strains with antitumour activities intensively were discovered. 3 strains were fermented on a large scale. The separation, purification and configuration analysis of bio-active substances with antitumor is being processed. 24 moulds and 31 bacterium were identified according to morphology and molecular biology methods. The result showed that most of molds distributed in *Paecilomyces*、*Penicillium*、*Aspergillus*, bacterium mostly belong to *Bacillus*、*Halomonas* and *Pseudomonas* et al.

Keywords: screening; identification; marine microorganisms; bio-activities; the tropical Pacific Ocean

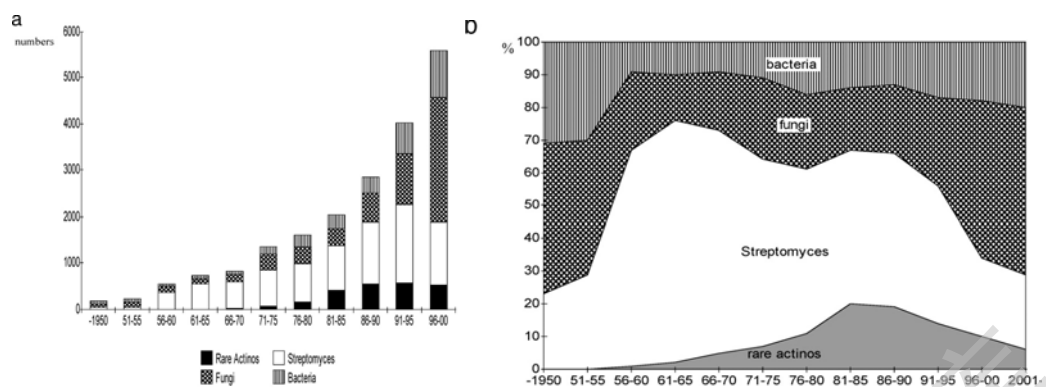
1 前言

海洋覆盖了地球表面的 71%，其中 60%左右是水深大于 2000m 的深海区。从海洋表层到次表层栖息着各种各样的生物。在 11000m 的马里亚纳海沟，甚至在太平洋海底沉积层的 500m 深处，都发现了活细菌。在已被描述的 36 门生物中，有 34 门发现于海洋，而陆地仅有 17 门，呈现了异常丰富的生物多样性。同时，由于海洋占据了地球的大部分空间，其生物储量极大，根据估测，海洋细菌的现存量约为 3×10^{28} cells，是宇宙中肉眼可见的星星的 1 亿多倍。由于海洋微生物分布广，对环境适应性强，并且能耐受海洋的各种极端环境，具有物种、基因、生理生态多样性，具备特殊的功能酶，可产生新、奇的活性物质，因而海洋特别是深海微生物资源倍受重视。自从 1966 年第一次从海洋溴假单胞菌（*Pseudomonas bromotilis*）分离到具有抗生素活性的硝吡咯菌素以来，人们开始了对海洋药源微生物的研究，在天然产物报道期刊中，不断收录海洋微生物活性物质的新发现。

1.1 活性微生物研究简史

从 Fleming 发现青霉素那个时代到今天，抗生素研究经历了令人兴奋、持续变化和发展的历程。超过半个世纪的抗生素研究，直接导致了上万种来源于微生物的次级代谢产物的发现。

显而易见，各种各样的放线菌，尤其是链霉菌、丝状真菌和一些细菌是最主要的具有生物活性的次级代谢产物的生产者。不同的时期，人类对它们的研究热情也发生着变化。在抗生素研究的早期，真菌（*Penicillin*, *Griseofulvin*）和细菌（*Gramicidin*）是研究的热点，链霉素以及后来氯霉素、四环素的发现，人们把目光投向链霉菌。上世纪五、六十年代，大多数的（70%）抗生素是由链霉菌产生。接下来的 20 年，非链霉菌即稀有放线菌的重要性不断增加，由稀有放线菌产生的抗生素所占的份额一度达到 25%—30%。近些年来，特别是从 90 年代早期到上世纪末，由丝状真菌产生的抗生素，占到这段时间产生的抗生素总和的 50% 以上。最近，由细菌产生的抗生素数量也成微弱增加的趋势，见图 1-1。

图 1-1 不同来源的抗生素的数量分布^[1]**Fig.1-1 distribution of the discovered antibiotics according to their origin**

原核生物，单细胞细菌中，枯草杆菌属和假单胞菌属是最重要的抗生素生产者。近年来研究发现，藻青菌和粘细菌也是不可多得的抗生素产生菌。由细菌产生的具有生物活性的次级代谢产物大约有 3800 种，占有所有微生物产生的次级代谢产物的 17%。丝状放线菌产生的具有生物活性的化合物超过 10000 种，占总微生物产生的次级代谢产物的 45%，其中 7600 种来源于链霉菌，2500 种由稀有放线菌产生。

在所有的真菌中，子囊菌和其他的几种丝状内生真菌，是抗生素主要产生菌。由担子菌类产生的抗生素也时常有报道，然而酵母菌、phycomycetes、slime moulds 产生的抗生素报道不多见。具有生物活性的真菌次级代谢产物大约有 8600 种，占有所有微生物次级代谢产物的 38%，见表 1-1。

表 1-1 活性微生物次级代谢产物数量分布^[1]
 Table 1-1 approximate number of bioactive microbial
 metabolites according to their producers and bioactivities

Source	Bioactive secondary microbial metabolites				
	Antibiotics		Bioactive metabolites		
	Total	With Other activity	No antibiotic activity	antibiotics Plus “other bioactives”	Total bioactive metabolites
Bacteria	2900	(780)	900	(1680)	3800
Eubacteriales	2170	(570)	580	(1150)	2750
Bacillus sp.	795	(235)	65	(300)	860
Pseudomonas sp.	610	(185)	185	(370)	795
Myxobacter	400	(130)	10	(140)	410
Cyanobacter	300	(80)	340	(420)	640
Actinomycetales	8700	(2400)	1400	(3800)	10100
Streptomyces sp	6550	(1920)	1080	(3000)	7630
Rare actinos	2250	(580)	220	(800)	2470
Fungi	4900	(2300)	3700	(6000)	8600
Microscopic fungi	3770	(2070)	2680	(4750)	6450
<i>Penicillium/Aspergillus</i>	1000	(450)	950	(1400)	1950
Basidiomycetes	1050	(200)	950	(1150)	2000
Yeasts	105	(35)	35	(70)	140
Slime moulds	30	(5)	20	(25)	60
Total Microbial	16500	(5500)	6000	(11500)	22500
Protozoa	35	(10)	5	(45)	50

1.2 海洋活性微生物研究概况

1.2.1 海洋微生物多样性

目前,关于什么是真正的海洋微生物仍有争议.一般认为,分离自海洋环境,其生长需要海水,并可在寡营养、低温条件下生长的微生物可视为严格的海洋微生物.然而,有些分离自海洋的微生物,其生长不一定需要海水,但可产生不同于陆地微生物的代谢物(如溴代化合物抗生素)或拥有某些特殊的生理性质(如耐盐性、液化琼脂等),也被视为海洋微生物^[2]。

虽然海洋微生物所处环境(高盐、高压、低温、低照)具有特殊性,但其种类却包括几乎所有的微生物种类^[3]。这些微生物中不仅包括海洋中生物起源的种类,而且有陆地起源后流入海洋中并适应了海洋环境的微生物种类。前者因海洋环境

的独特而具有特殊的生理性状和遗传背景,后者则因发生生理上和代谢系统的适应,形成了与陆地微生物不同的代谢系统。值得注意的是,除了自由生活于水体(包括附生于其中的无机颗粒和有机体残骸)和海底沉积层外,相当多的海洋微生物与其他的海洋生物处于共生、附生、寄生或共栖关系。

表 1-2 海洋微生物的分类^[3]

Table 1-2 Classification of marine microorganisms

非细胞类生物: 病毒 Viruses
古菌: Archaea
化能自养菌: 产甲烷细菌 Methangens;嗜热酸细菌 Thermoacidophiles
化能异养菌: 嗜盐细菌 Halophiles
细菌 Bacteria
光能自养菌
厌氧光合菌: 紫色光合细菌和绿色光合细菌(红螺菌目 Rhodospirillales)
有氧光合菌: 兰细菌 Cyanobacteria(兰细菌目 Cyanobacteriales)
原绿植物菌 Prochlorophytes(原绿菌目 Prochlorales)
化能自养菌: 硫化细菌(硝化杆菌科 Nitrobacteraceae);无色氧化硫细菌
甲烷氧化菌(甲烷球菌科 Methylococcaceae)
化能异养菌
革兰氏阳性菌: 产内孢棒状菌和球状菌;不产孢棒状菌;不产孢球状菌(微球菌科 Micrococceae);放线菌(放线菌目 Actinomycetales)及其相关菌
革兰氏阴性菌: 棒状菌和球状菌: 好氧菌(假单胞菌科 Pseudomonadaceae)
兼性菌(弧菌科 Vibrionaceae);厌氧菌(还原硫细菌)
滑动细菌;嗜细胞菌目 Cytophagales;贝日阿托氏菌目 Beggiatoales
(粘细菌目 Myxobacteriales)
螺旋菌: 螺旋体目 Spirochaetales
螺状和弯曲状菌: 螺菌科 Spirillaceae
发芽和/或附枝状细菌
枝原体: 柔膜体纲 Mollicutes
真核生物 Eucarya
光合自养菌: 微藻 Microalgae
化能异养菌: 原生动物门: 鞭毛藻 Flagellates;阿米巴 Amoebae;纤毛虫 Ciliates
真菌: 高等真菌: 子囊菌门 Ascomycota;担子菌门 Basidiomycota
低等真菌: 壶菌门 Chytridiomycota;接合菌门 Zygomycota

1.2.2 海洋活性微生物研究简史

从海洋微生物研究抗生素的历史可以追溯到 19 世纪末。1889 年, De Giaksa 发现海水对炭蛆杆菌和霍乱弧菌的生长具有抑制作用,指出海洋微生物可能产生

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库